

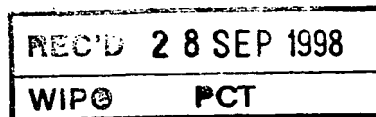
09/486094

5610
5050



PCT/53

98/01814



5

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

PRIORITY DOCUMENT

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le **24 JUL. 1998**

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cédex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30



26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

BREVET D'INVENTION, CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle-Livre VI

cerfa
N° 55-1328

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

DATE DE REMISE DES PIÈCES

20 AOUT 1997

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

97 10632

DÉPARTEMENT DE DÉPÔT

LY

DATE DE DÉPÔT

20 AOUT 1997

1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

RHONE-POULENC AGROCHIMIE
Franck TETAZ
B.P. 9163
69263 LYON CEDEX 09

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

☒ brevet d'invention

☐ demande divisionnaire

☐ certificat d'utilité

☐ transformation d'une demande
de brevet européen

demande initiale

☐ brevet d'invention

n° du pouvoir permanent références du correspondant

10.07.97 PH 97054

téléphone

04 72 85 2592

☐ certificat d'utilité n°

date

Établissement du rapport de recherche

☐ différé

☒ immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

☐ oui

☐ non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

Gène codant pour l'androctonine, vecteur le contenant et plantes transformées obtenues résistantes aux maladies"

3 DEMANDEUR (S)

n° SIREN

code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

RHONE-POULENC AGROCHIMIE

Forme juridique

S.A.

Nationalité (s) française

Adresse (s) complète (s)

14-20 rue Pierre Baizet
69009 LYON,

Pays

FRANCE

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre ☐

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs

☐ oui

☒ non Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

☐ requise pour la 1ère fois

☐ requise antérieurement au dépôt ; joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n°

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

(nom et qualité du signataire - n° d'inscription)

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'IN

A. CHAPELAN



BREVET D'INVENTION, CERTIFICAT D'UTILITE

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

DIVISION ADMINISTRATIVE DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 Paris Cédex 08

Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

97 10632

(N/Réf : PH 97054)

TITRE DE L'INVENTION :

"Gène codant pour l'androctonine, vecteur le contenant et plantes transformées obtenues résistantes aux maladies"

LE(S) SOUSSIGNÉ(S)

Franck TETAZ

RHONE-POULENC AGROCHIMIE

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

DEROSE Richard
216 rue de St Cyr
69009 LYON

FREYSSINET Georges
21 rue de Nervieux
69450 ST CYR AU MONT D'OR

HOFFMANN Jules
5 rue Closener
67000 STRASBOURG

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

Lyon, le 20 Octobre 1997


Franck TETAZ

Gène codant pour l'androctonine, vecteur le contenant et plantes transformées obtenues
résistantes aux maladies

5 La présente invention a pour objet une séquence d'ADN codant pour l'androctonine, un vecteur la contenant pour la transformation d'un organisme hôte et le procédé de transformation dudit organisme.

L'invention concerne plus particulièrement la transformation des cellules végétales et des plantes, l'androctonine produite par les plantes transformées leur conférant une
10 résistance aux maladies, en particulier d'origine fongique.

Il existe aujourd'hui un besoin grandissant de rendre les plantes résistantes contre les maladies notamment fongiques afin de diminuer, voire d'éviter, d'avoir recours à des traitements avec des produits de protection antifongiques, en vue de protéger l'environnement. Un moyen d'augmenter cette résistance aux maladies consiste à
15 transformer les plantes de manière qu'elles produisent des substances à même d'assurer leur défense contre ces maladies.

On connaît différentes substances d'origine naturelle, en particulier des peptides, présentant des propriétés bactéricides ou fongicides, notamment contre les champignons responsables des maladies des plantes. Toutefois, le problème consiste à trouver de telles
20 substances qui pourront non seulement être produites par des plantes transformées, mais encore conserver leurs propriétés bactéricides ou fongicides et les conférer aux dites plantes. Au sens de la présente invention, on entend par bactéricide ou fongicide tant les propriétés bactéricides ou fongicides proprement dites que les propriétés bactériostatiques ou fongistatiques.

25 L'androctonine est un peptide produit par les scorpions de l'espèce *Androctonus australis*. Sa préparation par synthèse chimique est décrite par Ehret-Sabatier & coll., de même que ses propriétés antifongiques et antibactériennes *in vitro*.

Après avoir d'abord identifié le gène de l'androctonine, on a également trouvé qu'il pouvait être inséré dans un organisme hôte, en particulier une plante, pour exprimer
30 l'androctonine et conférer au dit organisme hôte des propriétés de résistance aux maladies fongiques et aux maladies d'origine bactérienne, apportant une solution particulièrement avantageuse au problème énoncé ci-dessus.

L'invention a donc d'abord pour objet un fragment d'acide nucléique codant pour l'androctonine, un gène chimère comprenant ledit fragment codant pour l'androctonine
35 ainsi que des éléments de régulation en position 5' et 3' hétérologues pouvant fonctionner dans un organisme hôte, en particulier dans les plantes et un vecteur pour la transformation des organismes hôtes contenant ce gène chimère, et l'organisme hôte transformé. Elle concerne aussi une cellule végétale transformée contenant au moins un fragment d'acide nucléique codant pour l'androctonine et une plante résistante aux maladies contenant la

dite cellule, en particulier régénérée à partir de cette cellule. Elle concerne enfin un procédé de transformation des plantes pour les rendre résistantes aux maladies dans lequel on insère un gène codant pour l'androctonine au moyen d'un vecteur approprié.

Par androctonine, on entend selon l'invention tout peptide comprenant
 5 essentiellement la séquence peptidique de 25 acides aminés décrite par Ehret-Sabatier & coll., ainsi que les séquences homologues équivalentes dans lesquelles certains acides aminés sont remplacés par des acides aminés différents mais équivalents sur des sites n'induisant pas de modification substantielle de l'activité antifongique ou antibactérienne de la dite séquence homologue. Par séquence peptidique comprenant essentiellement la
 10 séquence peptidique décrite par Ehret-Sabatier & coll., on entend non seulement l'androctonine mature décrite dans cette demande et définie par l'identificateur de séquence n° 1 (SEQ ID NO 1), mais également une telle séquence comprenant à l'une ou l'autre de ses extrémités, ou les deux, des résidus peptidiques nécessaires à son expression et ciblage dans un organisme hôte, en particulier une cellule végétale ou une plante.

15 La présente invention concerne donc d'abord un fragment d'acide nucléique, en particulier d'ADN, codant pour l'androctonine. Il peut s'agir selon l'invention d'un fragment isolé de *Androctonus australis*, ou encore un fragment dérivé, adapté pour l'expression de l'androctonine dans l'organisme hôte où le peptide sera exprimé. le fragment d'acide nucléique peut être obtenu selon les méthodes standards d'isolation et de
 20 purification, ou encore par synthèse selon les techniques usuelles d'hybridations successives d'oligonucléotides synthétiques. Ces techniques sont notamment décrites par Ausubel & coll.

Selon la présente invention, on entend par « fragment d'acide nucléique » une
 25 séquence nucléotidique pouvant être de type ADN ou ARN, de préférence de type ADN, en particulier ADNc, notamment double brin.

Selon un mode de réalisation de l'invention, le fragment d'acide nucléique codant pour l'androctonine est la séquence d'ADN décrite par l'identificateur de séquence n° 1 (SEQ ID NO 1), une séquence homologue ou une séquence complémentaire de ladite séquence, plus particulièrement la partie codante de cette SEQ ID NO1, correspondant aux
 30 bases 1 à 75.

Par « homologue », on entend selon l'invention un fragment d'acide nucléique présentant une ou plusieurs modifications de séquence par rapport à la séquence nucléotidique décrite par l'identificateur de séquence n° 1 et codant pour l'androctonine. Ces modifications peuvent être obtenues selon les techniques usuelles de mutation, ou
 35 encore en choisissant les oligonucléotides synthétiques employés dans la préparation de ladite séquence par hybridation. Au regard des multiples combinaisons d'acides nucléiques pouvant conduire à l'expression d'un même acide aminé, les différences entre la séquence de référence décrite par l'identificateur de séquence n° 1 et l'homologue peuvent être importantes, d'autant plus qu'il s'agit d'un fragment d'ADN de taille

inférieure à 100 acides nucléiques, réalisable par synthèse. De manière avantageuse, le degré d'homologie sera d'au moins 70 % par rapport à la séquence de référence, de préférence d'au moins 80 %, plus préférentiellement d'au moins 90 %. Ces modifications sont généralement neutres, c'est à dire qu'elles n'affectent pas la séquence primaire de l'androctonine résultante.

La présente invention concerne également un gène chimère (ou cassette d'expression) comprenant une séquence codante ainsi que des éléments de régulation en position 5' et 3' hétérologues pouvant fonctionner dans un organisme hôte, en particulier les cellules végétales ou les plantes, la séquence codante comprenant au moins un fragment d'ADN codant pour l'androctonine tel que défini ci-dessus.

Par organisme hôte, on entend tout organisme mono ou pluricellulaire, inférieur ou supérieur, dans lequel le gène chimère selon l'invention peut être introduit, pour la production d'androctonine. Il s'agit en particulier de bactéries, par exemple *E. coli*, de levures, en particulier des genres *Saccharomyces* ou *Kluyveromyces*, ou de préférence des cellules végétales et des plantes.

Par "cellule végétale", on entend selon l'invention toute cellule issue d'une plante et pouvant constituer des tissus indifférenciés tels que des cals, des tissus différenciés tels que des embryons, des parties de plantes, des plantes ou des semences.

On entend par "plante" selon l'invention, tout organisme multicellulaire différencié capable de photosynthèse, en particulier monocotylédones ou dicotylédones, plus particulièrement des plantes de culture destinées ou non à l'alimentation animale ou humaine, comme le maïs, le blé, le colza, le soja, le riz, la canne à sucre, la betterave, le tabac, le coton, etc.

Les éléments de régulation nécessaires à l'expression du fragment d'ADN codant pour l'androctonine sont bien connus de l'homme du métier en fonction de l'organisme hôte. Ils comprennent notamment des séquences promotrices, des activateurs de transcription, des peptides de transit, des séquences terminatrices, y compris des codons start et stop. Les moyens et méthodes pour identifier et sélectionner les éléments de régulation sont bien connus de l'homme du métier.

Le fragment d'acide nucléique selon l'invention peut également comprendre une séquence d'acide nucléique fusionnée en 5' et/ou en 3' à la séquence codant pour l'androctonine, de manière à obtenir une protéine de fusion « protéine-androctonine », dont la coupure par les systèmes enzymatiques de l'organisme hôte permet la libération de l'androctonine. Cette protéine fusionnée à l'androctonine peut être un peptide signal ou un peptide de transit qui permet de contrôler et d'orienter la production de l'androctonine de manière spécifique dans une partie de l'organisme hôte, comme par exemple le cytoplasme, la membrane cellulaire, ou dans le cas des plantes dans un type particulier de tissus ou dans la matrice extracellulaire.

Selon un mode de réalisation, le peptide de transit peut être un signal d'adressage

chloroplastique ou mitochondrial, lequel est ensuite clivé dans les chloroplastes ou les mitochondries.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, le peptide signal peut être un signal N-terminal ou « prépeptide », éventuellement en association avec un signal responsable de la rétention de la protéine dans le réticulum endoplasmique, ou un peptide d'adressage vacuolaire ou « propeptide ». Le réticulum endoplasmique est le lieu où sont pris en charge par la « machinerie cellulaire » des opérations de maturation de la protéine produite, comme par exemple le clivage du peptide signal.

L'invention concerne plus particulièrement la transformation des plantes. Comme séquence de régulation promotrice dans les plantes, on peut utiliser toute séquence promotrice d'un gène s'exprimant naturellement dans les plantes en particulier un promoteur d'origine bactérienne, virale ou végétale tel que, par exemple, celui d'un gène de la petite sous-unité de ribulose-biscarboxylase (RuBisCO) ou d'un gène de virus de plante tel que, par exemple, celui de la mosaïque du chou fleur (CAMV 19S ou 35S), ou un promoteur inducible par les pathogènes comme PR-1a du tabac ou AoPRT-L d'asperge, tout promoteur convenable connu pouvant être utilisé. De préférence on a recours à une séquence de régulation promotrice qui favorise la surexpression de la séquence codante de manière constitutive ou induite par l'attaque d'un pathogène, tel que par exemple, celle comprenant au moins un promoteur d'histone tel que décrit dans la demande EP 0 507 698.

Selon l'invention, on peut également utiliser, en association avec la séquence de régulation promotrice, d'autres séquences de régulation, qui sont situées entre le promoteur et la séquence codante, telles que des activateurs de transcription ("enhancer"), comme par exemple l'activateur de translation du virus du tabac (TEV) décrit dans la demande WO 87/07644, ou des peptides de transit, soit simples, soit doubles, et dans ce cas éventuellement séparés par une séquence intermédiaire, c'est à dire comprenant, dans le sens de la transcription, une séquence codant pour un peptide de transit d'un gène végétal codant pour une enzyme à localisation plastidiale, une partie de séquence de la partie mature N-terminale d'un gène végétal codant pour une enzyme à localisation plastidiale, puis une séquence codant pour un second peptide de transit d'un gène végétal codant pour une enzyme à localisation plastidiale. constituée d'une partie de séquence de la partie mature N-terminale d'un gène végétal codant pour une enzyme à localisation plastidiale, tels que décrit dans la demande EP 0 508 909. Comme peptide de transit, on peut citer le peptide signal du gène PR-1a du tabac décrit par Cornelissen & coll., représenté avec sa séquence codante par l'identificateur de séquence n° 2.

La séquence codant pour la protéine de fusion peptide signal PR-1a-androctonine et cette protéine de fusion sont également partie de la présente invention. Cette séquence est notamment décrite par l'identificateur de séquence n° 3, plus particulièrement la partie codante de cette séquence, correspondant aux bases 12 à 176.

Comme séquence de régulation terminatrice ou de polyadénylation, on peut utiliser

toute séquence correspondante d'origine bactérienne, comme par exemple le terminateur nos d'*Agrobacterium tumefaciens*, ou encore d'origine végétale, comme par exemple un terminateur d'histone tel que décrit dans la demande EP 0 633 317.

Selon la présente invention, le gène chimère peut également comprendre un marqueur de sélection adapté à l'organisme hôte transformé. De tels marqueurs de sélection sont bien connus de l'homme du métier. Il pourra s'agir d'un gène de résistance aux antibiotiques, comme la pénicilline, ou encore un gène de tolérance aux herbicides pour les plantes.

La présente invention concerne également un vecteur de clonage ou d'expression pour la transformation d'un organisme hôte contenant au moins un gène chimère tel que défini ci-dessus. Ce vecteur comprend outre le gène chimère ci-dessus, au moins une origine de répllication. Ce vecteur peut être constitué par un plasmide, un cosmide, un bactériophage ou un virus, transformés par l'introduction du gène chimère selon l'invention. De tels vecteurs de transformation en fonction de l'organisme hôte à transformer sont bien connus de l'homme du métier et largement décrits dans la littérature.

Pour la transformation des cellules végétales ou des plantes, il s'agira notamment d'un virus qui peut être employé pour la transformation des plantes développées et contenant en outre ses propres éléments de répllication et d'expression. De manière préférentielle, le vecteur de transformation des cellules végétales ou des plantes selon l'invention est un plasmide.

L'invention a encore pour objet un procédé de transformation des organismes hôtes, en particulier des cellules végétales par intégration d'au moins un fragment d'acide nucléique ou un gène chimère tels que définis ci-dessus, transformation qui peut être obtenue par tout moyen connu approprié, amplement décrit dans la littérature spécialisée et notamment les références citées dans la présente demande, plus particulièrement par le vecteur selon l'invention.

Une série de méthodes consiste à bombarder des cellules ou des protoplastes avec des particules auxquelles sont accrochées les séquences d'ADN. Une autre série de méthodes consiste à utiliser comme moyen de transfert dans la plante un gène chimère inséré dans un plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens* ou Ri d'*Agrobacterium rhizogenes*.

D'autres méthodes peuvent être utilisées telles que la micro-injection ou l'électroporation, ou encore la précipitation directe au moyen de PEG.

L'homme du métier fera le choix de la méthode appropriée en fonction de la nature de l'organisme hôte, en particulier de la cellule végétale ou de la plante.

La présente invention a encore pour objet les organismes hôtes, en particulier cellules végétales ou plantes, transformés et contenant une quantité efficace d'un gène chimère comprenant une séquence codante pour l'androctonine définie ci-dessus.

La présente invention a encore pour objet les plantes contenant des cellules

transformées, en particulier les plantes régénérées à partir des cellules transformées. La régénération est obtenue par tout procédé approprié qui dépende de la nature de l'espèce, comme par exemple décrit dans les références ci-dessus.

Les plantes ainsi transformées sont résistantes à certaines maladies, en particulier à
 5 certaines maladies fongiques ou bactériennes. De ce fait, la séquence d'ADN codant pour l'androctonine peut être intégrée avec pour objectif principal la réalisation de plantes résistantes aux dites maladies, l'androctonine étant efficace contre des maladies fongiques telles que celles causées par *Botrytis*, en particulier *Botrytis cinerea*, *Cercospora*, en particulier *Cercospora beticola*, *Cladosporium* en particulier *Cladosporium herbarum*,
 10 *Fusarium*, en particulier *Fusarium culmorum* ou *Fusarium graminearum*, ou par *Phytophthora*, en particulier *Phytophthora cinnamomi*.

Dans ce cas, le gène chimère pourra comprendre également et de manière avantageuse au moins un marqueur de sélection, tel qu'un ou plusieurs gènes de tolérance aux herbicides.

15 La séquence d'ADN codant pour l'androctonine peut également être intégrée comme marqueur de sélection lors de la transformation de plantes avec d'autres séquences codant pour d'autres peptides ou protéines d'intérêt, comme par exemple des gènes de tolérance aux herbicides.

De tels gènes de tolérance aux herbicides sont bien connus de l'homme du métier et
 20 notamment décrits dans les demandes de brevet EP 115 673, WO 87/04181, EP 337 899, WO 96/38567 ou WO 97/04103.

Bien entendu, les cellules et plantes transformées selon l'invention peuvent comprendre outre la séquence codant pour l'androctonine, d'autres séquences hétérologues codant pour d'autres peptides complémentaires susceptibles de conférer à la plante des
 25 résistances à d'autres maladies d'origine bactérienne ou fongique.

Les autres séquences peuvent être intégrées au moyen du même vecteur comprenant un gène chimère, lequel comprend une première séquence codant pour l'androctonine et au moins une autre séquence codant pour un autre peptide ou protéine d'intérêt.

30 Elles peuvent également être intégrées au moyen d'un autre vecteur comprenant au moins la dite autre séquence, selon les techniques usuelles définies ci-dessus.

Les plantes selon l'invention peuvent encore être obtenues par croisement de parents, l'un portant le gène selon l'invention codant pour l'androctonine, l'autre portant un gène codant pour au moins un autre peptide ou protéine d'intérêt.

35 Parmi les séquences codant pour d'autres peptides antifongiques, on peut citer celle codant pour la drosomycine, décrite dans la demande de brevet FR 2 725 992 et par Fehlbaum & coll. (1994), et dans la demande de brevet non publiée FR 97 09115 déposée le 24 juillet 1997.

Les exemples ci-après permettent d'illustrer l'invention, la préparation de la

séquence codant pour l'androctonine, du gène chimère, du vecteur d'intégration et des plantes transformées. Les figures 1 à 5 en annexe décrivent les structures schématiques de certains plasmides préparés pour la construction des gènes chimères. Dans ces figures, les différents sites de restriction sont marqués en *italiques*.

5

Exemple 1: Construction des gènes chimères

Toutes les techniques employées ci-après sont des techniques standard de laboratoire. Les protocoles détaillés de ces techniques sont notamment décrits dans Ausubel & coll.

10

pRPA-MD-P: Création d'un plasmide contenant le signal peptide du gène PR-1a du tabac.

Les deux oligonucléotides synthétiques complémentaires Oligo 1 et Oligo 2 ci-après, sont hybridés à 65 °C pendant 5 minutes puis par diminution lente de la température à 30°C pendant 30'.

15

Oligo 1: 5' GCGTCGACGC GATGGGTTTC GTGCTTTTCT CTCAGCTTCC
ATCTTTCCTT CTTGTGTCTA CTCTTCTTCT TTTCC 3'

20

Oligo 2: 5' TCGCCGGCAC GGCAAGAGTA AGAGATCACA AGGAAAAGAA
GAAGAGTAGA CACAAGAAGG AAAGATGGAA GC 3'

25

Après hybridation entre l'Oligo 1 et l'Oligo 2, l'ADN resté simple brin sert de matrice au fragment klenow de la polymérase 1 de *E. coli* (dans les conditions standard préconisées par le fabricant (New England Biolabs)) pour la création de l'oligonucléotide double brin à partir de l'extrémité 3' de chaque oligo. L'oligonucléotide double brin obtenu est ensuite digéré par les enzymes de restriction *SacII* et *NaeI* et cloné dans le plasmide pBS II SK(-) (Stratagene) digéré par les mêmes enzymes de restriction. On obtient alors un clone comprenant la région codant pour peptide signal du gène PR-1a du tabac (SEQ ID NO 2).

30

pRPA-PS-PR1a-andro: Création d'une séquence codant pour l'androctonine fusionnée au signal peptide PR-1a sans région non transcrite en 3'.

35

Les deux oligonucléotides synthétiques complémentaires de séquences Oligo 3 et Oligo 4 selon les conditions opératoires décrites pour pRPA-MD-P.

Oligo 3: 5' AGGTCCGTGT GCAGGCAGAT CAAGATCTGC AGGAGGAGGG
GTGG 3'

Oligo 4: 5' CCGGATCCGT CGACACGTTT GCCTCGCCGA GCTCAGTATG
 GCCTGTTAGT GCACTTGTAG TAGCAACCAC CCCTCCTCCT
 GCAGATCTTG ATCTGCC 3'

5 Après hybridation entre l'Oligo 3 et l'Oligo 4, l'ADN resté simple brin sert de matrice au fragment klenow de la polymérase 1 de *E. coli* (dans les conditions standard préconisées par le fabricant (New England Biolabs)) pour la création de l'oligonucléotide double brin à partir de l'extrémité 3' de chaque oligo. Cet oligonucléotide double brin contenant la partie codante de l'androctonine (SEQ ID NO 1) est ensuite cloné directement
 10 dans le plasmide pRPA-MD-P qui a été digéré avec l'enzyme de restriction *NaeI*. L'orientation correcte du clone obtenu est vérifiée par séquençage. On obtient alors un clone comprenant la région codant pour la protéine de fusion PR-1a-androctonine située entre les sites de restriction *NcoI* à l'extrémité N-terminale et *ScaI*, *SacII* et *BamHI* à l'extrémité C-terminale (SEQ ID NO 3).

15

pRPA-RD-238: Création d'un vecteur d'expression dans les plantes comprenant la la séquence codant pour la protéine de fusion PR-1a-androctonine.

Le plasmide pRTL-2 GUS, dérivé du plasmide pUC-19, a été obtenu auprès du Dr. Jim Carrington (Texas A&M University, non décrit). Ce plasmide dont la structure
 20 schématique est représentée sur la figure 1, contient le promoteur CaMV 35S dupliqué isolé du virus de la mosaïque du chou fleur (Promoteur CaMV 2x35S; Odell & coll., 1985) qui dirige l'expression d'un ARN contenant séquence non traduite en 5' du virus et du tabac (TEV 5' UTR; Carrington & Freed, 1990), le gène de la β -glucuronidase de *E. coli* (GUS Jefferson & coll., 1987) suivi du site de polyadénylation de l'ARN 35S de
 25 CaMV (CaMV polyA; Odell & coll., 1985).

Le plasmide pRTL-2 GUS est digéré avec les enzymes de restriction *NcoI* et *BamHI* et le grand fragment d'ADN est purifié. Le plasmide pRPA-PS-PR1a-andro est digéré avec les enzymes de restriction *NcoI* et *BamHI* et le petit fragment d'ADN contenant la région codant pour la protéine de fusion PR-1a-androctonine est purifié. Les
 30 deux fragments d'ADN purifiés sont ensuite liés ensemble dans une cassette d'expression dans les plantes qui synthétise une protéine de fusion PR-1a-androctonine. La structure schématique de cette cassette d'expression est représentée sur la figure 2. « PR-1a-androctonine » représente la région codante pour la protéine de fusion PR-1a-androctonine de pRPA-RD-230. L'androctonine est transportée vers la matrice extra-cellulaire de la
 35 plante par l'action du peptide signal PR-1a.

pRPA-RD-195: Création d'un plasmide contenant un site de clonage multiple modifié.

Le plasmide pRPA-RD-195 est un plasmide dérivé du pUC-19 qui contient un site

de clonage multiple modifié. Les oligonucléotides synthétiques complémentaires Oligo 5 et Oligo 6 ci-après, sont hybridés et rendus double brin selon la procédure décrite pour pRPA-MD-P.

5 Oligo 5: 5' AGGGCCCCCT AGGGTTTAAA CGGCCAGTCA GGCCGAATTC
GAGCTCGGTA CCCGGGGATC CTCTAGAGTC GACCTGCAGG
CATGC 3'

10 Oligo 6: 5' CCCTGAACCA GGCTCGAGGG CGCGCCTTAA TTTAAAGCTT
GCATGCCTGC AGGTCGACTC TAGAGG 3'

L'oligonucléotide double brin obtenu est ensuite lié dans pUC-19 qui a été préalablement digéré avec les enzymes de restriction *EcoRI* et *HindIII* et rendu bouts francs en employant le fragment klenow de l'ADN polymérase 1 de *E. coli*. On obtient un vecteur contenant de multiples sites de clonage pour faciliter l'introduction des cassettes d'expression dans un plasmide vecteur d'*Agrobacterium tumefaciens*. La structure schématique de ce site de clonage multiple est représentée sur la figure 3.

20 **pRPA-RD-233: Introduction de la cassette d'expression de PR-1a-androctonine de pRPA-RD-230 dans pRPA-RD-195.**

Le plasmide pRPA-RD-230 est digéré avec l'enzyme de restriction *HindIII*. Le fragment d'ADN contenant la cassette d'expression de PR-1a-androctonine est purifié. Le fragment purifié est ensuite lié dans pRPA-RD-195 qui a été préalablement digéré avec l'enzyme de restriction *HindIII* et déphosphorylé avec la phosphatase intestinale de veau.

25 **pRPA-RD-174: Plasmide dérivé de pRPA-BL-150A (EP 0 508 909) contenant le gène de tolérance au bromoxynil de pRPA-BL-237 (EP 0 508 909).**

Le gène de tolérance au bromoxynil est isolé de pRPA-BL-237 par une amplification génique par PCR. Le fragment obtenu est à bouts francs et est cloné dans le site *EcoRI* de pRPA-BL-150A qui a été rendu bouts francs par l'action de la polymérase klenow dans des conditions standard. On obtient un vecteur d'*Agrobacterium tumefaciens* qui contient le gène de tolérance au bromoxynil à proximité de sa bordure droite, un gène de tolérance à la kanamycine à proximité de sa bordure gauche et un site de clonage multiple entre ces deux gènes.

35 La structure schématique de pRPA-RD-174 est représentée sur la figure 4. Sur cette figure, "nos" représente le site de polyadénylation de la nopaline synthase d'*Agrobacterium tumefaciens* (Bevan & coll., 1983), "NOS pro" représente le promoteur de la nopaline synthase d'*Agrobacterium tumefaciens* (Bevan & coll., 1983), "NPT II" représente le gène de la néomycine phosphotransférase du transposon Tn5 de *E. coli*

(Rothstein & coll., 1981), "35S pro" représente le promoteur 35S isolé du virus de la mosaïque du chou fleur (Odell & coll., 1985), "BRX" représente le gène de la nitrilase isolé de *K. ozaenae* (Stalker & coll., 1988), "RB" et "LB" représentent respectivement les bordures droite et gauche de la séquence d'un plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens*.

5

pRPA-RD-184: Addition d'un nouveau site de restriction, unique, dans pRPA-RD-174.

Les oligonucléotides synthétiques complémentaires Oligo 7 et Oligo 8 ci-après, sont hybridés et rendus double brin selon la procédure décrite pour pRPA-MD-P.

10

Oligo 7: 5' CCGGCCAGTC AGGCCACACT TAATTAAGTT TAAACGCGGC
 CCCGGCGCGC CTAGGTGTGT GCTCGAGGGC CCAACCTCAG
 TACCTGGTTC AGG 3'

15 Oligo 8: 5' CCGGCCTGAA CCAGGTACTG AGGTTGGGCC CTCGAGCACA
 CACCTAGGCG CGCCGGGGCC GCGTTTAAAC TTAATTAAGT
 GTGGCCTGAC TGG 3'

20 L'oligonucléotide double brin hybridé (95 paires de bases) est purifié après séparation sur un gel d'agarose (3 % Nusieve, FMC). Le plasmide pRPA-RD-174 est digéré avec l'enzyme de restriction *XmaI*, et le grand fragment d'ADN est purifié. Les deux fragments d'ADN obtenus sont ensuite liés.

25 On obtient un plasmide dérivé de pRPA-RD-174 comprenant d'autres sites de restriction entre le gène de tolérance au bromoxynil et le gène de la kanamycine marqueur de sélection.

La structure schématique du plasmide pRPA-RD-184 est représentée sur la figure 5 où les termes "nos", "NPT II", "NOS pro", "35S pro", "BRX gene", "RB" et "LB" ont la même signification que pour la figure 4.

30 **pRPA-RD-236: Création d'un vecteur d'*Agrobacterium tumefaciens* contenant la construction du gène codant pour l'androctonine dirigée vers la matrice extracellulaire.**

35 La plasmide pRPA-RD-233 est digéré avec les enzymes de restriction *PmeI* et *AscI* et le fragment d'ADN contenant le gène de PR-1a-androctonine est purifié. Le plasmide pRPA-RD-184 est digéré avec les mêmes enzymes de restriction. Le fragment d'ADN contenant la cassette d'expression de PR-1a-androctonine est ensuite liée dans pRPA-RD-184. On obtient ainsi un vecteur d'*Agrobacterium tumefaciens* contenant la séquence codant pour la protéine de fusion PR-1a-androctonine qui conduit à l'expression de l'androctonine dans la matrice extracellulaire de la plante.

Exemple 2: Tolérance aux herbicides des tabacs transformés.

2.1- Transformation

Le vecteurs pRPA-RD-236 est introduit dans la souche *d'Agrobacterium tumefaciens* EHA101 (Hood & coll., 1987) porteuse du cosmide pTVK291 (Komari & coll., 1986). La technique de transformation est basée sur la procédure de Horsh & coll. (1985).

2.2- Régénération

La régénération du tabac PBD6 (provenance SEITA France) à partir d'explants foliaires est réalisée sur un milieu de base Murashige et Skoog (MS) comprenant 30 g/l de saccharose ainsi que 200 µg/ml de kanamycine. Les explants foliaires sont prélevés sur des plantes cultivées en serre ou *in vitro* et régénérées selon la technique des disques foliaires (Horsh & coll., 1985) en trois étapes successives: la première comprend l'induction des pousses sur un milieu additionné de 30 g/l de saccharose contenant 0,05 mg/l d'acide naphtylacétique (ANA) et 2 mg/l de benzylaminopurine (BAP) pendant 15 jours. Les pousses formées au cours de cette étape sont ensuite développées pendant 10 jours par culture sur un milieu MS additionné de 30 g/l de saccharose mais ne contenant pas d'hormone. Puis on prélève des pousses développées et on les cultive sur un milieu d'enracinement MS à teneur moitié en sels, vitamines et sucre et ne contenant pas d'hormone. Au bout d'environ 15 jours, les pousses enracinées sont passées en terre.

2.3- Tolérance au bromoxynil

Vingt plantes transformées ont été régénérées et passées en serre pour la construction pRPA-RD-236. Ces plantes ont été traitées en serre au stade 5 feuilles avec une suspension aqueuse de Pardner correspondant à 0,2 kg de matière active bromoxynil par hectare.

25

Toutes les plantes montrant une tolérance complète au bromoxynil sont ensuite employées dans différentes expérimentations qui montrent que l'expression de l'androctonine par les plantes transformées les rend résistantes aux agressions fongiques.

REFERENCES

- Ausubel, F. A. & coll. (eds. Greene). Current Protocols in Molecular Biology. Publ. Wiley & Sons.
- 5 Bevan, M. & coll. (1983). Nuc. Acids Res. **11**:369-385.
- Carrington and Freed (1990). J. Virol. **64**:1590-1597.
- Ehret-Sabatier & coll. (1996) The Journal of Biological Chemistry, **271**, **47**, 29537-29544.
- Horsch & coll. (1985). Science **227**:1229-1231.
- Jefferson & coll. (1987). EMBO J. **6**:3901-3907.
- 10 Komari & coll. (1986). J. Bacteriol. **166**:88-94.
- Rothstein & coll. (1981). Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. **45**: 99-105.
- Stalker & coll. (1988). J. Biol. Chem. **263**:6310-6314.
- Odell, J.T. & coll. (1985). Nature **313**:810-812.

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATIONS GENERALES:

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 14

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 110 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: double
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMBLACEMENT: 1..75

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

AGG	TCC	GTG	TGC	AGG	CAG	ATC	AAG	ATC	TGC	AGG	AGG	AGG	GGT	GGT	TGC	48
Arg	Ser	Val	Cys	Arg	Gln	Ile	Lys	Ile	Cys	Arg	Arg	Arg	Gly	Gly	Cys	
1					5				10					15		
TAC	TAC	AAG	TGC	ACT	AAC	AGG	CCA	TAC	TGAGCTCGGC	GAGGCGAACG						95
Tyr	Tyr	Lys	Cys	Thr	Asn	Arg	Pro	Tyr								
			20					25								
TGTCGACGGA	TCCGG															110

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 106 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: double
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMBLACEMENT: 12..101

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

GCGTCGACGC	C	ATG	GGT	TTC	GTG	CTT	TTC	TCT	CAG	CTT	CCA	TCT	TTC	CTT		50
	Met	Gly	Phe	Val	Leu	Phe	Ser	Gln	Leu	Pro	Ser	Phe	Leu			
	1					5					10					
CTT	GTG	TCT	ACT	CTT	CTT	CTT	TTC	CTT	GTG	ATC	TCT	CAC	TCT	TGC	CGT	98
Leu	Val	Ser	Thr	Leu	Leu	Leu	Phe	Leu	Val	Ile	Ser	His	Ser	Cys	Arg	
	15					20					25					
GCC	GGCGA															106
Ala																
30																

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 211 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: double

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: CDS

(B) EMPLACEMENT: 12..176

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

GCGTCGACGC C ATG GGT TTC GTG CTT TTC TCT CAG CTT CCA TCT TTC CTT	50
Met Gly Phe Val Leu Phe Ser Gln Leu Pro Ser Phe Leu	
1 5 10	
CTT GTG TCT ACT CTT CTT CTT TTC CTT GTG ATC TCT CAC TCT TGC CGT	98
Leu Val Ser Thr Leu Leu Leu Phe Leu Val Ile Ser His Ser Cys Arg	
15 20 25	
GCC AGG TCC GTG TGC AGG CAG ATC AAG ATC TGC AGG AGG AGG GGT GGT	146
Ala Arg Ser Val Cys Arg Gln Ile Lys Ile Cys Arg Arg Arg Gly Gly	
30 35 40 45	
TGC TAC TAC AAG TGC ACT AAC AGG CCA TAC TGAGCTCGGC GAGGCGAACG	196
Cys Tyr Tyr Lys Cys Thr Asn Arg Pro Tyr	
50 55	
TGTCGACGGA TCCGG	211

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 75 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(A) DESCRIPTION: /desc = "oligonucléotide synthétique 1"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

GCGTCGACGC GATGGGTTTC GTGCTTTTCT CTCAGCTTCC ATCTTTCCTT CTTGTGTCTA	60
CTCTTCTTCT TTTCC	75

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 5:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 72 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(A) DESCRIPTION: /desc = "oligonucléotide synthétique 2"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

TCGCCGGCAC GGCAAGAGTA AGAGATCACA AGGAAAAGAA GAAGAGTAGA CACAAGAAGG	60
AAAGATGGAA GC	72

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 44 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(A) DESCRIPTION: /desc = "oligonucléotide synthétique 3"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

AGGTCCGTGT GCAGGCAGAT CAAGATCTGC AGGAGGAGGG GTGG

44

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 7:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 97 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(A) DESCRIPTION: /desc = "oligonucléotide synthétique 4"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

CCGGATCCGT CGACACGTTT GCCTCGCCGA GCTCAGTATG GCCTGTAGT GCACTTGTAG

60

TAGCAACCAC CCCTCCTCCT GCAGATCTTG ATCTGCC

97

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 8:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 85 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(A) DESCRIPTION: /desc = "oligonucléotide synthétique 5"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

AGGGCCCCCT AGGGTTTAAA CGGCCAGTCA GGCCGAATTC GAGCTCGGTA CCCGGGGATC

60

CTCTAGAGTC GACCTGCAGG CATGC

85

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 9:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 66 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(A) DESCRIPTION: /desc = "oligonucléotide synthétique 6"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:

CCCTGAACCA GGCTCGAGGG CGCGCCTTAA TTAAAAGCTT GCATGCCTGC AGGTCGACTC

60

TAGAGG

66

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 10:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 93 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique
(A) DESCRIPTION: /desc = "oligonucléotide synthétique 7"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 10:

CCGGCCAGTC AGGCCACACT TAATTAAGTT TAAACGCGGC CCCGGCGCGC CTAGGTGTGT 60

GCTCGAGGGC CCAACCTCAG TACCTGGTTC AGG 93

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 11:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 93 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique
(A) DESCRIPTION: /desc = "oligonucléotide synthétique 8"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 11:

CCGGCCTGAA CCAGGTACTG AGGTTGGGCC CTCGAGCACA CACCTAGGCG CGCCGGGGCC 60

GCGTTTAAAC TTAATTAAGT GTGGCCTGAC TGG 93

REVENDICATIONS

1. Fragment d'acide nucléique, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence d'acide nucléique codant pour l'androctonine.
- 5 2. Fragment d'acide nucléique selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il s'agit d'une séquence nucléotidique de type ADN, en particulier ADNc.
3. Fragment d'acide nucléique selon la revendication 2, caractérisé en ce que la séquence nucléotidique de type ADN est la séquence d'ADN décrite par l'identificateur de séquence n° 1 (SEQ ID NO 1), une séquence homologue ou une séquence-----
- 10 complémentaire de ladite séquence.
4. Fragment d'acide nucléique selon la revendication 3, caractérisé en ce que la séquence nucléotidique de type ADN est la partie codante de la SEQ ID NO 1, correspondant aux bases 1 à 75.
5. Fragment d'acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé
- 15 en ce qu'il comprend une séquence d'acide nucléique fusionnée en 5' et/ou en 3' à la séquence codant pour l'androctonine, de manière à obtenir une protéine de fusion « protéine-androctonine ».
6. Fragment d'acide nucléique selon la revendication 5, caractérisé en ce que la protéine est un peptide signal ou un peptide de transit.
- 20 7. Fragment d'acide nucléique selon la revendication 6, caractérisé en ce que le peptide signal est le peptide signal du gène PR-1a du tabac.
8. Fragment d'acide nucléique selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence d'ADN décrite par l'identificateur de séquence n° 3 (SEQ ID NO 3), une séquence homologue ou une séquence complémentaire de ladite séquence.
- 25 9. Fragment d'acide nucléique selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'il comprend la partie codante de la SEQ ID NO 3, correspondant aux bases 12 à 176.
10. Protéine de fusion « protéine-androctonine », caractérisée en ce que la protéine est un peptide signal ou un peptide de transit.
11. Protéine de fusion selon la revendication 10, caractérisée en ce que le
- 30 peptide signal est le peptide signal du gène PR-1a du tabac.
12. Protéine de fusion selon la revendication 11, caractérisée en ce qu'elle est décrite par l'identificateur de séquence n° 3 (SEQ ID NO 3).
13. Gène chimère comprenant une séquence codante ainsi que des éléments de régulation en position 5' et 3' hétérologues pouvant fonctionner dans un organisme hôte, en
- 35 particulier les plantes, caractérisé en ce que la séquence codante comprend au moins un fragment d'ADN codant pour l'androctonine tel que défini dans les revendications 1 à 9.
14. Gène chimère selon la revendication 13, caractérisé en ce que l'organisme hôte est choisi parmi les cellules végétales et les plantes.
15. Gène chimère selon l'une des revendications 13 ou 14, caractérisé en ce

qu'il comprend également un marqueur de sélection.

16. Vecteur de clonage ou d'expression pour la transformation d'un organisme hôte caractérisé en ce qu'il comprend au moins une origine de réplication et au moins un gène chimère tel que défini dans les revendications 13 à 15.

5 17. Vecteur selon la revendication 16, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un virus employé pour la transformation des plantes développées et contenant en outre ses propres éléments de réplication et d'expression.

18. Vecteur selon la revendication 16, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un plasmide.

10 19. Organismes hôtes transformés, caractérisés en ce qu'ils contiennent une quantité efficace d'un gène chimère selon les revendications 13 à 15.

20. Organisme hôte transformé selon la revendication 19, caractérisé en ce qu'il s'agit de cellules végétales ou de plantes.

15 21. Organisme hôte transformé selon la revendication 20, caractérisé en ce qu'il s'agit d'une plante contenant des cellules transformées.

22. Organisme hôte selon la revendication 21, caractérisé en ce que la plante est régénérée à partir des cellules transformées.

20 23. Cellule végétale transformée, caractérisée en ce qu'elle contient un fragment d'acide nucléique selon les revendications 1 à 9 ou un gène chimère selon les revendications 13 à 15.

24. Plante transformée résistante aux maladies, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une cellule végétale transformée selon la revendication 23.

25 25. Plante transformée selon la revendication 24, caractérisée en ce qu'elle est résistante aux maladies causées par *Botrytis*, en particulier *Botrytis cinerea*, *Cercospora*, en particulier *Cercospora beticola*, *Cladosporium* en particulier *Cladosporium herbarum*, *Fusarium*, en particulier *Fusarium culmorum* ou *Fusarium graminearum*, ou par *Phytophthora*, en particulier *Phytophthora cinnamomi*.

30 26. Procédé de transformation des organismes hôtes, en particulier des cellules végétales ou des plantes, caractérisé en ce que l'on insère dans ledit organisme hôte au moins un fragment d'acide nucléique selon les revendications 1 à 9 ou un gène chimère selon l'une des revendication 13 à 15.

35 27. Procédé de transformation des plantes pour les rendre résistantes aux maladies fongiques ou bactériennes, caractérisé en ce que l'on insère dans la plante au moins un fragment d'acide nucléique selon les revendications 1 à 9 ou un gène chimère selon les revendications 13 à 15.

28. Procédé selon l'une des revendications 26 ou 27, caractérisé en ce que le, gène chimère est inséré au moyen d'un vecteur selon l'une des revendications 16 à 18.

1/2

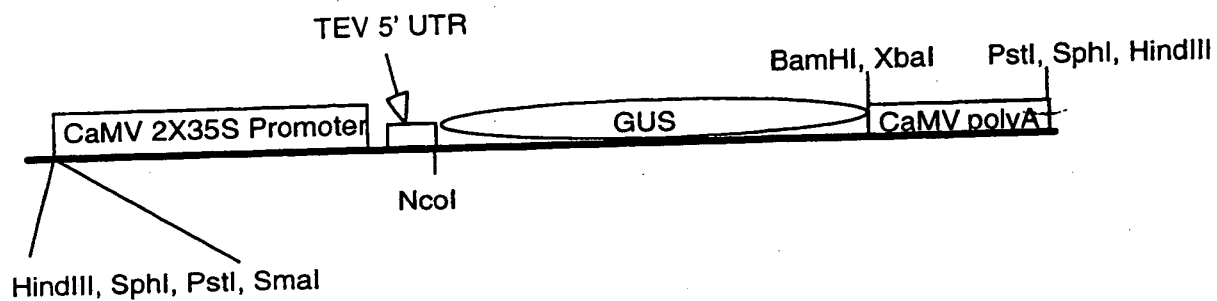


Fig. 1

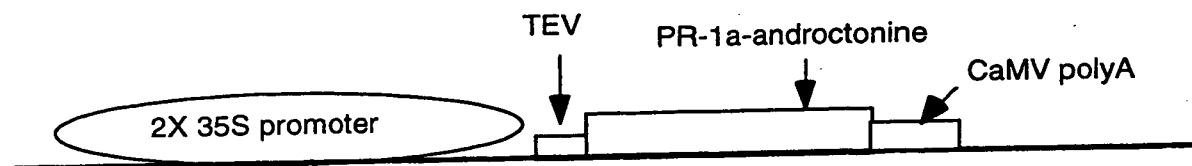


Fig. 2

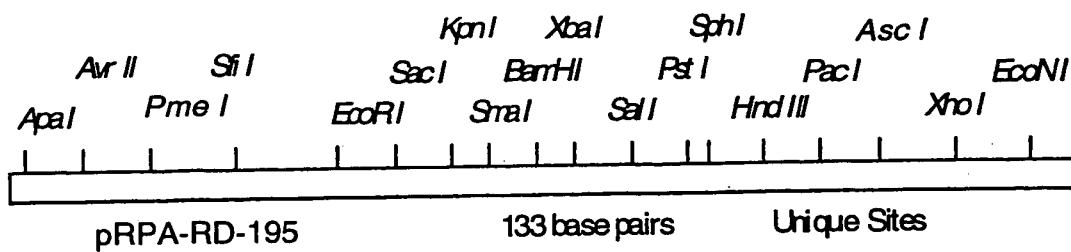


Fig. 3

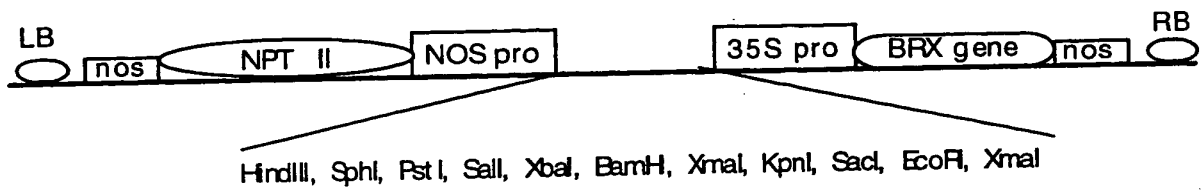


Fig. 4

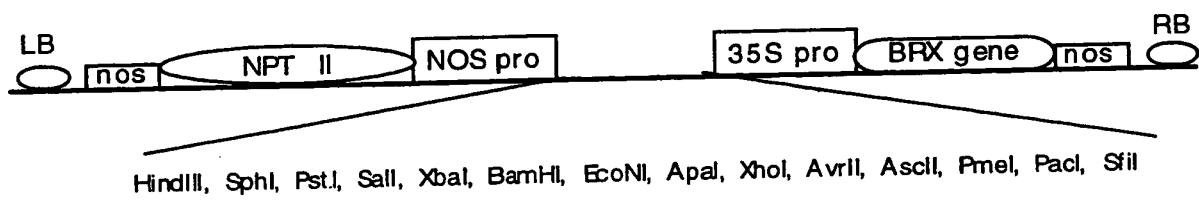


Fig. 5



1